

アンチセンス, リボザイムによる抗DNA抗体関連遺伝子の特異的な発現制御

著者	鈴木 陽子
号	1357
発行年	1997
URL	http://hdl.handle.net/10097/21404

論 文 内 容 要 旨

自己免疫疾患の多くにおいては特定の自己抗体が病態を形成するとされているので、特定の免疫グロブリン (Ig) 遺伝子の発現を選択的に抑制する方法の開発が期待される。本研究では、特定の Ig 遺伝子を抑制することにより、臓器障害性自己抗体の産生を制御することを試みた。このために、アンチセンス、リボザイム系を検討し、これが特定の重鎖可変部領域遺伝子 (VH 遺伝子) に作用することにより選択的に抗体を制御する系の有用性を求めた。

ヒトループス腎炎における、腎障害性抗 DNA 抗体産生を特異的に制御する系のモデルとしてヒトループス腎炎由来のモノクロナル抗 DNA 抗体産生クローン O-81 を用いた。このクローンにおいて抗体産生を担う胚細胞型 VH 遺伝子 V3-7 の発現をアンチセンスおよびリボザイムで選択的に制御することを計った。

1. Ig 遺伝子 V3-7 の上流の特異的塩基配列および O-81 クローンに特異的な Ig 超可変部領域の塩基配列 (CDR2) の各々に選択的に反応するアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム発現ベクターを作成した。

2. V3-7 アンチセンスは濃度依存性に O-81 クローンにおける抗 DNA 抗体産生を抑制し最大で 75 % の制御を認め、その有用性が示唆された。一方、この効果は VH 遺伝子の異なる他の B 細胞クローンでの抗体産生を抑制しなかった。

3. アンチセンスの効果は一過性なので、持続的に特異的制御を導く方法としてリボザイムの開発を試みた。まず、*in vitro* cleavage 法により、*in vitro* において作成したリボザイム RNA が標的 RNA を切断することを確認した。

4. V3-7 の上流および O-81 CDR2 の各々に反応するリボザイムを pLNCX ベクターに挿入し、O-81 クローンに導入した。V3-7 リボザイムが実際に導入されていることを *in situ* hybridization 法により確認した。リボザイムが導入されたクローンについては、V3-7 の mRNA が特異的に抑制された。ELISA 法においても抗 DNA 抗体産生が約 70 % 抑制されることを確認した。一方、V3-7 リボザイムは、他の VH 遺伝子 (VH4-21, V3-31) を使用するクローンにおいては Ig 遺伝子の発現および抗体産生について抑制しなかった。

5. V3-7 の上流に作用する RNase 耐性化学修飾リボザイムオリゴヌクレオチドを 2 種作成し、これらとアンチセンスをそれぞれ O-81 クローン培養系に添加した。その結果リボザイムオリゴヌクレオチドはアンチセンスよりもより低濃度で抗体産生を抑制し得、効果も持続した。

アンチセンス、リボザイムによる自己免疫疾患、特に病的自己抗体を抑制する系は、標的 Ig 遺伝子の特定が困難なことから報告がない。VH 遺伝子を標的とした病的自己抗体の特異的抑

制は、臓器障害に関わる自己抗体のみを特異的に、しかも副作用のない方法で制御し得る治療法の開発へと導く可能性が期待される。

審査結果の要旨

全身性エリテマトーデス SLE の治療には、免疫全般へ強い抑制や、造血障害他の種々の副作用を惹起しうるステロイド剤、免疫抑制剤が用いられる。自己免疫疾患、特に SLE では、抗 DNA 自己抗体が腎病変形成の主たる原因とされるので、この産生に特異的抑制を計ることは、より望ましい治療法として期待しうる。本研究では、これまで SLE ループス腎炎とされる抗 DNA 抗体の性状を明らかにし、かつ、この腎障害性抗体を産生するヒト B 細胞クローン 0-81 を樹立してきた。本研究では、このクローンで使用されている、腎障害性抗 DNA 抗体を規定する病的自己抗体の特異的制御の可能性を追求した。

1) V3-7 遺伝子上流の特異的塩基配列と 0-81 クローンに特異的な Ig 超可変部塩基配列 (CDR) の、それぞれに選択的に反応しうるアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム発現ベクターおよびリボザイムオリゴヌクレオチドを作成した。2) 作成したアンチセンスについて、0-81 クローンでの抗 DNA 抗体産生の抑制効果を *in vitro* の系で検討した。その結果、V3-7 アンチセンスは濃度依存性に 0-81 クローンによる抗 DNA 抗体産生を抑制し、最大で 75% の抑制効果をもたらした。3) しかし、アンチセンスの効果は一時的であり、より明瞭かつ持続的に特異的制御を導く方法として V3-7 および CDR のリボザイム法の開発を試みた。まず、*in vitro* cleavage 法により作成した。次に、それぞれのリボザイムを pLNCX ベクターに挿入し、0-81 クローンに導入すると、導入クローンにおける V3-7 の mRNA レベルでの特異的抑制を認めた。ELISA 法での抗 DNA 抗体活性の検討でも約 70% の抑制を示した。一方、V3-7 リボザイムは、V3-7 以外の VH 遺伝子 (VH4-21, V3-31) を使用するクローンにおいては Ig 遺伝子発現を抑制しなかった。4) ベクターを用いない遺伝子発現制御手段として、化学修飾を行い、RNase 抵抗性を有するリボザイムオリゴヌクレオチドを開発した。これを抗 DNA 抗体産生系に添加したところ、アンチセンスに比較して抗体産生の制御がより著明で、かつ、その効果も持続した。この抑制は病的抗 DNA 抗体 VH 遺伝子を特異的に誘導できた。

Ig 遺伝子を標的としたアンチセンス/リボザイムによる病的自己抗体産生の特異的制御が可能であることを示した。これまでに自己免疫疾患、特に特定の病的抗体産生を遺伝子 (mRNA) レベルで制御した報告はなく、国内外における初めての知見とされる。さらに、本研究では臨床応用への展開を計るため、ベクターを用いた遺伝子治療ではなく、薬剤としての修飾型リボザイムの有用性も示唆した。他の数多くの自己免疫病治療でのモデルとなり得、かつ、臨床への展開が期待しうる意義深い研究であり、学位に十分値するものと思われる。